

Genomic constitution of gametes and preimplantation embryos

Citation for published version (APA):

Coonen, E. (1995). *Genomic constitution of gametes and preimplantation embryos*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19950323ec>

Document status and date:

Published: 01/01/1995

DOI:

[10.26481/dis.19950323ec](https://doi.org/10.26481/dis.19950323ec)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Preimplantation diagnosis is a new method to detect genetic disorders in embryos at the earliest stages of development and may serve as an alternative to prenatal diagnosis for couples at risk of transmitting inherited diseases to their children. A reliable technique that can be widely applied for the detection of chromosomal abnormalities in preimplantation diagnosis, is the *in situ* hybridisation (ISH) procedure using DNA probes. In this study the ISH approach was chosen for the identification of the genotype of human gametes and preimplantation embryos. Different aspects of the application of the ISH procedure in preimplantation diagnosis are addressed in the general introduction (chapter 1). The ISH method allows analysis of both numerical and structural aberrations in metaphase chromosomes, but more important, also in interphase nuclei. Although the information obtained by ISH is limited to the DNA targets examined, it has the advantage that virtually every cell is informative, in contrast to conventional karyotyping. Furthermore, the ISH procedure is not hampered by contamination, which is a distinct advantage over the PCR method for analysis of single cells.

The application of the ISH technique in human spermatozoa has allowed an evaluation of aneuploidy levels in these gametes (chapter 2).

The application of the ISH technique to determine the sex of preimplantation embryos has been established some years ago. However, the conventionally applied method for spreading of whole human embryos or single human blastomeres involved methanol:acetic acid fixation and had some disadvantages with respect to cell morphology and cell yield. Moreover, this cell spreading procedure was labourious and required an exact timing of the subsequent preparation steps. Because of the limited number of cells that are available for diagnosis (1 or 2 blastomeres in case of a biopsy on day three), much effort has been put into the improvement of *efficiency* and *reproducibility* of the spreading procedure and subsequent ISH of embryonic cells. Pilot studies using murine embryos enabled the development of a new procedure to prepare and isolate interphase nuclei from preimplantation embryos for analysis by fluorescence ISH. Using this method we could perform successful genomic analyses on all studied preimplantation stages of the mouse embryo (pronuclei, 2-cell, 4-cell, morula and blastocyst). From the results described we conclude that the preparation and isolation of interphase nuclei from murine embryos with the improved procedure, using an extraction step with hydrochloric acid (pH 2) and a detergent (Tween20), offers a high reproducibility, a good morphology of the cells and a high hybridisation efficiency (chapter 3).

The improvement in *sensitivity* of the developed ISH procedures also enabled implementation of more advanced ISH technologies, in particular the use of DNA probes specific for unique sequences. We assessed the feasibility of this approach in human blastomeres using the improved spreading method for single embryonic cells in combination with fluorescence ISH based on cosmid probes. Efficient cell spreading and pre-treatment procedures are prerequisites for reliable detection of unique sequences at the single cell level, in particular for preimplantation embryonic cells. Preliminary results on human blastomeres indicate that the application of ISH using cosmid probes can be performed with reasonable efficiency but is, when compared to the use of probes recognizing repetitive sequences, still subject to further improvement. Future studies should elucidate whether diagnostic application for the detection of structural aberrations in single cells in human preimplantation diagnosis will become applicable in a routine setting (chapter 4).

For preimplantation diagnosis, the biopsy, spreading and ISH analysis of single blastomeres and subsequent embryo transfer should preferably be performed within one day. There were, however, two limitations to current ISH procedures: Firstly, the loss of

nuclei when spreading single blastomeres and secondly, the time taken for the diagnosis. Since a reduction in the time needed for determination of the sex of human blastomeres is a prerequisite for an efficient preimplantation diagnosis programme, we have examined the possibility to *condense the ISH procedure* in such a way that it can be performed within one day. Using the modified spreading method and directly labelled DNA probes for the X- and Y chromosome, we could reduce the time needed for the analysis of human blastomeres to 2 hrs without a decrease in hybridisation efficiency. For this study normally fertilized human embryos were disaggregated, after which single blastomeres could be obtained. The spreading efficiency was 96% and ISH signals were obtained from 97% of the nuclei. In all cases, sibling blastomeres from the same embryo were of the same sex. The data reported confirm that by using an improved spreading method in combination with directly labelled DNA probes, we have increased the efficiency and reduced the time required for sexing embryos for preimplantation diagnosis of X-linked diseases (chapter 5).

Further studies were performed to gain insight into the *degree of genomic heterogeneity* displayed by human embryos. Such information is needed to determine whether blastomeres, removed from the embryo for preimplantation diagnosis, reflect the genomic make-up of the whole embryo.

The extent of chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos resulting from abnormal fertilization was examined using the improved procedures for the preparation and spreading of embryonic interphase nuclei. In only 3 of the 38 embryos that were included in this study, one of the cells showed no hybridisation signals (99% hybridisation efficiency per successfully spread nucleus). Double-target ISH analyses with X and Y chromosome specific probes were performed to analyse embryos resulting from normal fertilization, polypronucleate embryos and cleavage-stage embryos with no (apronucleate), or only 1 (monopronucleate) visible nucleus. We also analysed embryos from these categories with double-target ISH for autosomes 1 and 7. All embryos that resulted from normal fertilization were uniformly XY or XX. None of the apronucleate or monopronucleate embryos was haploid: three were diploid, one was triploid, and three were mosaic. The fact that fertilization had occurred was indicated by the presence of a Y-specific signal in four of these embryos. Of the polypronucleate embryos, two were diploid, two were triploid, and 18 were mosaic for the sex chromosomes and/or autosomes 1 and 7. These results demonstrate that fertilization does occur in some monopronucleate embryos and that chromosomal mosaicism can be detected with high efficiency in apronucleate, monopronucleate and polypronucleate human embryos using fluorescence in situ hybridisation (chapter 6).

Embryos resulting from normal fertilization and showing a good morphology were examined at the 6-10 cell stage to assess the incidence of chromosomal mosaicism, for both sex chromosomes and autosomes 1 and 17 by using double-target ISH. For the sex chromosomes, 15% of the embryos were mosaic. In none of the cases was an XX nucleus found in an otherwise XY embryo, indicating that even when mosaicism for the sex chromosomes occurs, this does not lead to misdiagnosis of the sex of the embryo. For the autosomes, one embryo was triploid, one was monosomic for chromosome 1 and ten others were (diploid) mosaics. A further four embryos had variable chromosome numbers in the majority of the nuclei, which appeared to be the result of uncontrolled mitotic division. Haploidy or double monosomy occurred in 15% of the nuclei. For preimplantation diagnosis based on ISH, genetic heterogeneity could lead to misdiagnosis, especially in case of a disomy/trisomy mosaicism (chapter 7).

On basis of these data we highly recommend the analysis of two blastomeres (if possible) for preimplantation diagnosis. In case the results from both cells are conflicting, embryo transfer should not take place.

Samenvatting

Pre-implantatie diagnostiek is een recent ontwikkelde methode die het mogelijk maakt om genetische afwijkingen te detecteren in embryo's tijdens de vroegste stadia van de ontwikkeling. Pre-implantatie diagnostiek kan een alternatief zijn voor prenatale diagnostiek bij paren die een hoog risico hebben op het krijgen van kinderen met een erfelijke aandoening. Een betrouwbare methode, die op veel manieren toegepast kan worden voor de detectie van chromosomale afwijkingen ten behoeve van de pre-implantatie diagnostiek is de in situ hybridisatie (ISH) procedure. Voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gekozen voor ISH om het genotype van humane gameten (spermatozoa en oöcyten) en pre-implantatie embryo's te kunnen bestuderen. De verschillende aspecten die samenhangen met de toepassing van de ISH methode binnen de pre-implantatie diagnostiek komen in de algemene introductie aan de orde (hoofdstuk 1). Met behulp van de ISH methode kunnen zowel numerieke als structurele afwijkingen worden aangetoond in metafase chromosomen en, nog belangrijker, in interfase kernen. De genetische informatie die door middel van ISH verkregen wordt, blijft beperkt tot specifieke chromosomale regio's. Het voordeel is dat deze methode veel efficiënter is dan de klassieke karyotypering. Tevens is het een duidelijk voordeel dat de ISH methode, in tegenstelling tot de polymerase ketting reactie (PCR), niet nadelig beïnvloed wordt door de aanwezigheid van DNA van externe bronnen (bv zaadcellen).

De analyse van spermatozoa met behulp van fluorescentie ISH heeft het mogelijk gemaakt een uitspraak te doen over de incidentie van aneuploidie in deze gameten (hoofdstuk 2).

De geslachtsbepaling van pre-implantatie embryo's met behulp van ISH werd enkele jaren geleden geïntroduceerd. De methode die toen gebruikt werd voor de fixatie van humane embryo's en/of losse blastomeren maakte gebruik van een methanol: ijsazijn mengsel. Deze methode had grote nadelen waar het de cel morfologie en de cel opbrengst betrof. Tevens was deze preparatie methode erg arbeids-intensief en was veel ervaring vereist om de opeenvolgende stappen in de procedure juist uit te kunnen voeren. Omdat een pre-implantatie analyse slechts op zeer weinig cellen uitgevoerd kan worden (er zijn maar 1 à 2 cellen beschikbaar wanneer de biopsie op dag 3 plaatsvindt) is het van eminent belang dat de efficiëntie en reproduceerbaarheid van de blastomeer preparatie en aansluitende hybridisatie zo groot mogelijk is. Onderzoek uitgevoerd met muize-embryo's heeft geleid tot de ontwikkeling van een verbeterde preparatie methode voor embryonale interfase kernen die vervolgens met behulp van fluorescentie ISH geanalyseerd kunnen worden. Gebruikmakend van deze methode zijn we in staat geweest om embryo's van alle onderzochte pre-implantatie stadia (pronuclei, 2-cellig en 4-cellig stadium, morula en blastocyst) met succes te analyseren. Uit onze resultaten kunnen we concluderen dat de preparatie en isolatie van embryonale interfase kernen met behulp van een extractie op basis van zoutzuur en een detergens (Tween20) uitstekend te reproduceren is, dat de kernen een goede morfologie behouden en dat de efficiëntie van de ISH analyse hoog is (hoofdstuk 3).

De verbeterde gevoeligheid van de ontwikkelde methode heeft tevens tot resultaat gehad dat technisch moeilijker uitvoerbare ISH toepassingen, met name het gebruik van DNA probes die specifiek zijn voor unieke DNA sequenties, binnen bereik

gekomen zijn. We hebben onderzoek gedaan naar de toepasbaarheid van deze aanpak bij humane blastomeren, gebruikmakend van de ontwikkelde preparatie methode in combinatie met ISH op basis van cosmid probes. Een efficiënte spreiding van de cellen en een juiste voorbehandeling zijn noodzakelijk voor de betrouwbare detectie van unieke DNA sequenties in de geïsoleerde cellen van pre-implantatie embryo's. Onze eerste resultaten verkregen bij humane blastomeren tonen aan dat ISH met cosmid probes weliswaar redelijk efficiënt is maar, vergeleken met het gebruik van DNA probes voor repetitieve sequenties, nog altijd veel verbetering behoeft. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of een diagnostische toepassing voor de detectie van structurele afwijkingen op routinebasis beschikbaar zal komen (hoofdstuk 4).

Het is belangrijk dat de gehele pre-implantatie diagnose (biopsie en spreiding van cellen, ISH analyse en eventuele embryo transplantatie) binnen een dag kan worden uitgevoerd. Bestaande ISH procedures hadden echter twee nadelen. Het verlies aan cellen tijdens de spreiding was groot en de ISH analyse vergde veel tijd. Gezien het feit dat een aanzienlijke tijdswinst de efficiëntie van een pre-implantatie diagnose zou verhogen, hebben we getracht de ISH analyse zodanig te condenseren dat de totale procedure binnen 1 dag zou kunnen plaatsvinden. Gebruikmakend van de verbeterde preparatie methode in combinatie met rechtstreeks gelabelde probes voor het X- en het Y-chromosoom, zijn we in staat geweest de tijd, nodig voor een pre-implantatie diagnose terug te brengen tot 2 uur, zonder dat dit ten koste ging van de hybridisatie efficiëntie. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van geïsoleerde blastomeren van normale embryo's. De spreidings efficiëntie was 96% en van de geprepareerde kernen vertoonde 97% signalen na de ISH procedure. In alle gevallen waren blastomeren, afkomstig uit eenzelfde embryo, van hetzelfde geslacht. Deze resultaten geven aan dat we in staat geweest zijn om met behulp van de nieuwe preparatie methode en het gebruik van rechtstreeks gelabelde probes, de tijd, nodig voor een geslachtsbepaling ten behoeve van de pre-implantatie diagnostiek van geslachtsgebonden ziektes, te verkorten (hoofdstuk 5).

Tevens werden er studies uitgevoerd om de incidentie van chromosomaal mozaïcisme in humane embryo's te bestuderen. Deze informatie is van uitermate groot belang om te kunnen vaststellen in hoeverre gebiopteerde blastomeren representatief zijn voor het gehele embryo. Het voorkomen van chromosomaal mozaïcisme in embryo's ontstaan uit abnormaal bevruchte oöcyten werd onderzocht met behulp van de verbeterde procedures voor de preparatie en spreiding van embryonale cellen. Slechts in 3 van de 38 embryo's vertoonde een cel geen hybridisatie signalen na de ISH procedure (99% hybridisatie efficiëntie per geprepareerde cel). Met simultaan gebruik van X- en Y-specifieke DNA probes werd een ISH analyse uitgevoerd ter bestudering van normale embryo's, polypronucleaire embryo's en embryo's in verschillende klievingsstadia, waarin oorspronkelijk geen (apronucleair) of slechts een (monopronucleaire) zichtbare pronucleus aanwezig was. Deze embryo's werden ook onderzocht met DNA probes voor de autosomen 1 en 7. Alle normale embryo's uit deze studie bevatten uitsluitend XX of XY cellen. Geen enkel mono- of a-pronucleair embryo bleek haploïd te zijn: drie embryo's waren diploïd, een was er triploïd en drie vertoonden er een mozaïek patroon. Op basis van de aanwezigheid van een hybridisatie signaal voor het Y-chromosoom, konden we bij vier (oorspronkelijk) haploïde embryo's vaststellen dat er toch een bevruchting had plaatsgevonden.

Twee van de polypronucleaire embryo's waren diploïd, twee waren er triploïd en 18 vertoonden een mozaïek patroon voor de geslachtschromosomen en/of de autosomen 1 en 7. Onze resultaten geven aan dat monopronucleaire embryo's in een aantal gevallen toch bevrucht zijn en dat we, op basis van ISH, in staat zijn om met een hoge efficiëntie chromosomaal mozaïcisme aan te tonen in apronucleaire, monopronucleaire en polypronucleaire embryo's (hoofdstuk 6).

Normale embryo's met een goede morfologie werden bestudeerd tijdens het 6-10 cellig stadium om een uitspraak te kunnen doen over het voorkomen van chromosomaal mozaïcisme. Mozaïcisme voor de geslachtschromosomen werd aangetoond in ongeveer 15% van de onderzochte embryo's. Er werden echter geen XY dragende cellen gevonden in een vrouwelijk (XX) embryo. Deze bevindingen geven aan dat, ondanks het chromosomaal mozaïcisme voor de geslachtschromosomen, het geslacht van een embryo niet verkeerd geïnterpreteerd zal worden bij pre-implantatie diagnostiek. Ook werden resultaten verkregen na hybridisatie met DNA probes voor de autosomen 1 en 17. Een embryo bleek triploïd, een embryo vertoonde monosomie 1 en tien andere vertoonden mozaïcisme. In vier embryo's werden ongelijke aantallen chromosomen in verschillende kernen aangetroffen. Gelijktijdige monosomie voor de chromosomen 1 en 17, hetgeen een sterke aanwijzing is voor haploïdie, werd aangetoond in ongeveer 15% van de onderzochte kernen. Genetische heterogeniteit voor autosomen zou kunnen leiden tot een foutieve pre-implantatie diagnose, en wel specifiek in het geval van een diploïd/triploïd mozaïcisme (hoofdstuk 7). Op basis van deze resultaten bevelen we ten eerste de analyse aan van twee blastomeren voor pre-implantatie diagnostiek. Wanneer beide cellen na hybridisatie niet hetzelfde resultaat tonen, dient van embryotransplantatie te worden afgezien.